

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(AB)

(11)Publication number : 2000-103738

(43)Date of publication of application : 11.04.2000

(51)Int.Cl.

A61K 31/715
 A61P 43/00
 A61K 31/745
 A61L 27/00
 C12M 3/00
 C12N 5/10
 // C07H 7/033
 C08B 37/00

(21)Application number : 10-273895

(22)Date of filing : 28.09.1998

(71)Applicant :

(72)Inventor :

MARUHA CORP

HACHITSUKA NOBUAKI

SATO NOBUYUKI

MORIYAMA SHIGERU

TAMAI TADAKAZU

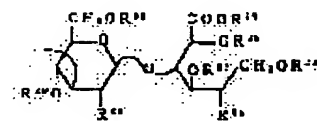
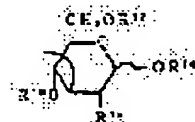
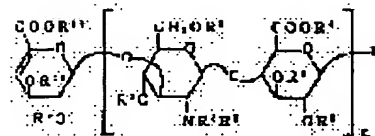
NISHIKAWA MASAZUMI

(54) PROMOTER FOR VASCULAR ENDOTHELIAL CELL GROWTH

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a promoter excellent in a growth accelerating effect on a vascular endothelial cell by including a compound having a glucuronic acid derivative and a glucosamine derivative in the structure as an active ingredient.

SOLUTION: A compound having a glucuronic acid derivative and a glucosamine derivative in formula I (R1 is a protecting group, OR12 [R12 is H, a protecting group, a group of formula II-IV (R14-R30 except for R15, R19 and R28 are each H or a protecting group; R15, R19 and R28 are each azido group or the like) or the like; R2-R8 and R9-R11 are each H or a protecting group; (n) is 0-25] is included as an active ingredient. Preferably, dose of the promoter per day for an adult is 0.01-100 mg/kg as an amount of the compound of formula I as the active ingredient in the case of oral administration and 0.001-10 mg/kg in the case of parenteral administration. The promoter is effective for a cardiovascular disease, a cerebrovascular disorder, or the like.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted to registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-103738

(P2000-103738A)

(43) 公開日 平成12年4月11日 (2000.4.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 6 1 K 31/715		A 6 1 K 31/715	4 B 0 2 9
A 6 1 P 43/00		31/00	6 4 3 C 4 B 0 6 5
A 6 1 K 31/745		31/745	4 C 0 5 7
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	U 4 C 0 8 1
C 1 2 M 3/00		C 1 2 M 3/00	A 4 C 0 8 6
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 21 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-273895

(22) 出願日 平成10年9月28日 (1998.9.28)

(71) 出願人 000003274

マルハ株式会社

東京都千代田区大手町1丁目1番2号

(72) 発明者 八塚 信明

茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社
社中央研究所内

(72) 発明者 佐藤 信行

茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社
社中央研究所内

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

最終頁に続く

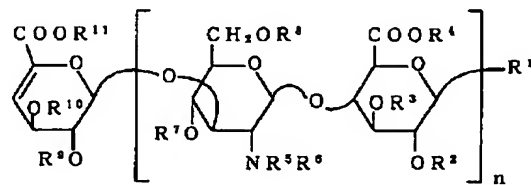
(54) 【発明の名称】 血管内皮細胞増殖促進剤

(57) 【要約】

【課題】優れた血管内皮細胞増殖促進剤、血管新生促進剤および人工臓器や医療用具に使用しうる優れた材料を提供する。

【解決手段】①下記一般式(1)で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和を有効成分として含む血管内皮細胞増殖促進剤、②一般式(1)で表される化合物を有効成分として含む細胞培養用組成物、③一般式(1)で表される化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を有効成分とする血管内皮細胞増殖促進用コーティング剤、④一般式(1)で表される化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を材料として用いた血管内皮細胞増殖促進用成型物、⑤前記成型物および/または前記コーティング剤を使用して製造した血管内皮細胞被覆型人工臓器、血管内皮細胞被覆型医療用具および細胞培養用器材。式(1)

【化1】

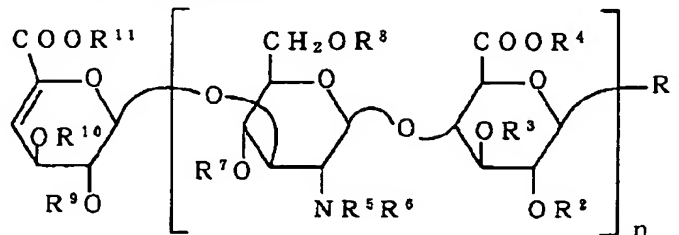


【特許請求の範囲】

【請求項1】下記一般式(1)で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または

塩の溶媒和物を有効成分として含む血管内皮細胞増殖促進剤。式(1)

【化1】



【式(1)中、R¹は保護基または下記式(2)～(5)を表す。式(2)～(5)中、R¹²は水素原子、保護基または下記式(6)～(8)を表し、R¹³は水素原子または保護基を表す。ただし、R¹²およびR¹³が水素原子または保護基である場合、R¹はCOOR⁴に対してトランス結合あるいはシス結合のどちらであってもよい。

式(2)

-OR¹²

式(3)

-NHR¹³

式(4)

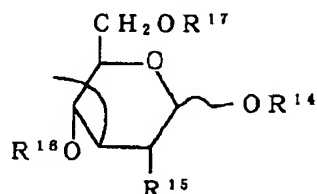
-CH₂R¹³

式(5)

-SR¹³

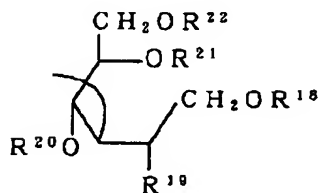
式(6)

【化2】



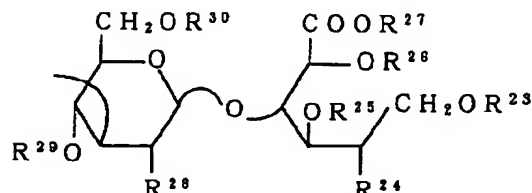
式(7)

【化3】



式(8)

【化4】



また、R¹²が式(6)～(8)である場合、式(6)～

(8)中、R¹⁵、R¹⁹およびR²⁸を除くR¹⁴～R³⁰は同一または異なって水素原子または保護基を表し、R¹⁵、R¹⁹およびR²⁸はアジド基または下記式(9)を表す。式

(9)

-NR³¹R³²

式(9)中、R³¹およびR³²は、同一または異なり水素原子または保護基を表す。式(1)中、R²～R⁸は同一または異なって水素原子または保護基を表す。式(1)中、R⁹～R¹¹は、同一または異なって水素原子または保護基を表す。式(1)中、nは0～25の整数を表す。(ただし、nが0のときは、R¹は式(2)、R¹²は式(8)で表される基である。)式(1)および式(6)～(8)中、保護基は互いに同一または異なり、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアルキル、置換されていてもよい炭素原子数2～8の直鎖または分枝鎖のアルケニル、置換されていてもよい炭素原子数1～8のアシル、置換されていてもよい芳香族アシル、または置換されていてもよい芳香族アルキルであり、またR¹⁵、R¹⁹およびR²⁸を除くR²～R³⁰の任意の保護基2つが一緒になって、置換されていてもよい炭素原子数3～8のアルキリデン、置換されていてもよい炭素原子数3～8の環状アルキリデン、置換されていてもよいベンジリデン、または、置換されていてもよいフタロイルを形成してもよい。また、nが2～25の場合、R²～R⁸は、繰り返し単位ごとに同一であっても異なってもよい。]

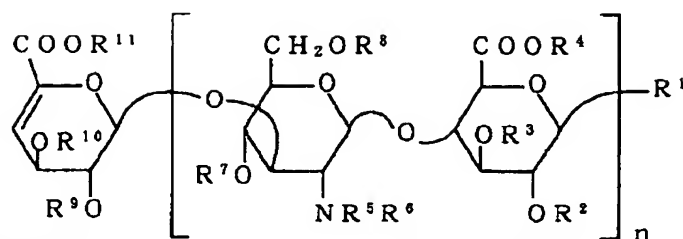
【請求項2】血管内皮再生療法のための治療薬または予防薬として使用する請求項1記載の血管内皮細胞増殖促進剤。

【請求項3】血管新生療法のための治療薬または予防薬として使用する請求項1記載の血管内皮細胞増殖促進剤。

【請求項4】下記一般式(1)で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物：

式(1)

【化5】



〔式(1)中、 R^1 は保護基または下記式(2)～(5)を表す。式(2)～(5)中、 R^{12} は水素原子、保護基または下記式(6)～(8)を表し、 R^{13} は水素原子または保護基を表す。ただし、 R^{12} および R^{13} が水素原子または保護基である場合、 R^1 は COOR^4 に対してトランス結合あるいはシス結合のどちらであってもよい。

式(2)

— OR^{12}

式(3)

— NHR^{13}

式(4)

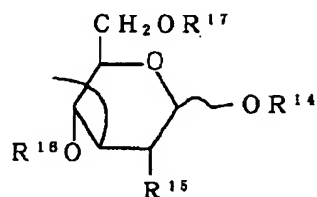
— CH_2R^{13}

式(5)

— SR^{13}

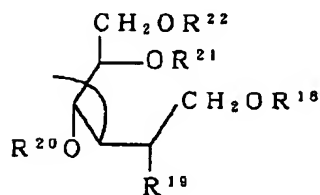
式(6)

【化6】



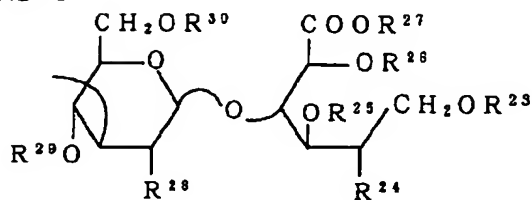
式(7)

【化7】



式(8)

【化8】



また、 R^{12} が式(6)～(8)である場合、式(6)～(8)中、 R^{15} 、 R^{19} および R^{28} を除く R^{14} ～ R^{30} は同一または異なって水素原子または保護基を表し、 R^{15} 、 R^{19} および R^{28} はアジド基または下記式(9)を表す。

式(9)

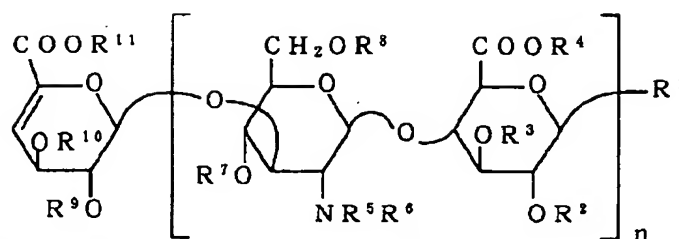
— $\text{NR}^{31}\text{R}^{32}$

式(9)中、 R^{31} および R^{32} は、同一または異なり水素原子または保護基を表す。式(1)中、 R^2 ～ R^8 は同一または異なって水素原子または保護基を表す。式(1)中、 R^9 ～ R^{11} は、同一または異なって水素原子または保護基を表す。式(1)中、 n は0～25の整数を表す。(ただし、 n が0のときは、 R^1 は式(2)、 R^{12} は式(8)で表される基である。)式(1)および式(6)～(8)中、保護基は互いに同一または異なり、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアルキル、置換されていてもよい炭素原子数2～8の直鎖または分枝鎖のアルケニル、置換されていてもよい炭素原子数1～8のアシル、置換されていてもよい芳香族アシル、または置換されていてもよい芳香族アルキルであり、また R^{15} 、 R^{19} および R^{28} を除く R^2 ～ R^{30} の任意の保護基2つが一緒になって、置換されていてもよい炭素原子数3～8のアルキリデン、置換されていてもよい炭素原子数3～8の環状アルキリデン、置換されていてもよいベンジリデン、または、置換されていてもよいフタロイルを形成してもよい。また、 n が2～25の場合、 R^2 ～ R^8 は、繰り返し単位ごとに同一であっても異なってもよい。〕または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を有効成分として含む細胞培養用組成物。

【請求項5】下記一般式(1)で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物：

式(1)

【化9】



〔式(1)中、R¹は保護基または下記式(2)～(5)を表す。式(2)～(5)中、R¹²は水素原子、保護基または下記式(6)～(8)を表し、R¹³は水素原子または保護基を表す。ただし、R¹²およびR¹³が水素原子または保護基である場合、R¹はCOOR⁴に対してトランス結合あるいはシス結合のどちらであってもよい。〕

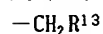
式(2)



式(3)



式(4)

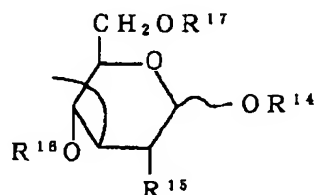


式(5)



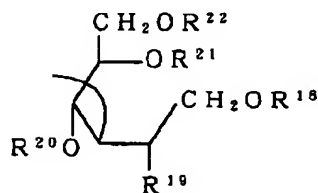
式(6)

【化10】



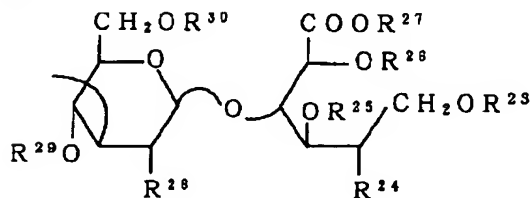
式(7)

【化11】



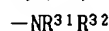
式(8)

【化12】



また、R¹²が式(6)～(8)である場合、式(6)～(8)中、R¹⁵、R¹⁹およびR²⁸を除くR¹⁴～R³⁰は同一または異なって水素原子または保護基を表し、R¹⁵、R¹⁹およびR²⁸はアジド基または下記式(9)を表す。

式(9)



式(9)中、R³¹およびR³²は、同一または異なり水素原子または保護基を表す。式(1)中、R²～R⁸は同一または異なって水素原子または保護基を表す。式(1)中、R⁹～R¹¹は、同一または異なって水素原子または保護基を表す。式(1)中、nは0～25の整数を表す。(ただし、nが0のときは、R¹は式(2)、R¹²は式(8)で表される基である。)

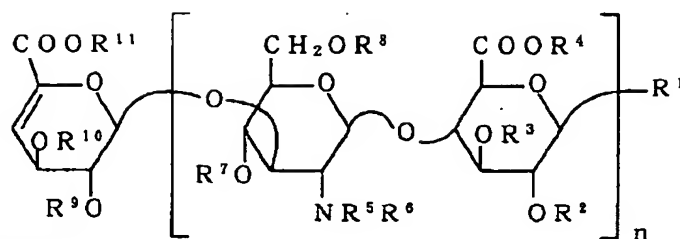
式(1)および式(6)～(8)中、保護基は互いに同一または異なり、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアルキル、置換されていてもよい炭素原子数2～8の直鎖または分枝鎖のアルケニル、置換されていてもよい炭素原子数1～8のアシル、置換されていてもよい芳香族アシル、または置換されていてもよい芳香族アルキルであり、またR¹⁵、R¹⁹およびR²⁸を除くR²～R³⁰の任意の保護基2つが一緒になって、置換されていてもよい炭素原子数3～8のアルキリデン、置換されていてもよい炭素原子数3～8の環状アルキリデン、置換されていてもよいベンジリデン、または、置換されていてもよいフタロイルを形成してもよい。また、nが2～25の場合、R²～R⁸は、繰り返し単位ごとに同一であっても異なってもよい。〕

または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を有効成分とする血管内皮細胞増殖促進用コーティング剤。

【請求項6】下記一般式(1)で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理学的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物：

式(1)

【化13】



〔式(1)中、 R^1 は保護基または下記式(2)～(5)を表す。式(2)～(5)中、 R^{12} は水素原子、保護基または下記式(6)～(8)を表し、 R^{13} は水素原子または保護基を表す。ただし、 R^{12} および R^{13} が水素原子または保護基である場合、 R^1 は COOR^4 に対してトランス結合あるいはシス結合のどちらであってもよい。

式(2)

$-\text{OR}^{12}$

式(3)

$-\text{NHR}^{13}$

式(4)

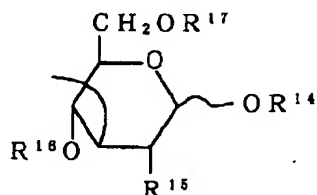
$-\text{CH}_2\text{R}^{13}$

式(5)

$-\text{SR}^{13}$

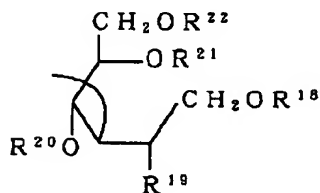
式(6)

【化14】



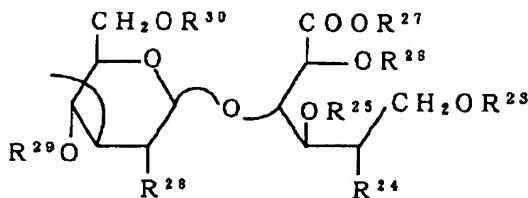
式(7)

【化15】



式(8)

【化16】



また、 R^{12} が式(6)～(8)である場合、式(6)～(8)中、 R^{15} 、 R^{19} および R^{28} を除く R^{14} ～ R^{30} は同一または異なって水素原子または保護基を表し、 R^{15} 、 R^{19} および R^{28} はアジド基または下記式(9)を表す。

式(9)

$-\text{NR}^{31}\text{R}^{32}$

式(9)中、 R^{31} および R^{32} は、同一または異なり水素原子または保護基を表す。式(1)中、 R^2 ～ R^8 は同一または異なって水素原子または保護基を表す。式(1)中、 R^9 ～ R^{11} は、同一または異なって水素原子または保護基を表す。式(1)中、 n は0～25の整数を表す。(ただし、 n が0のときは、 R^1 は式(2)、 R^{12} は式(8)で表される基である。)

式(1)および式(6)～(8)中、保護基は互いに同一または異なり、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアルキル、置換されていてもよい炭素原子数2～8の直鎖または分枝鎖のアルケニル、置換されていてもよい炭素原子数1～8のアシル、置換されていてもよい芳香族アシル、または置換されていてもよい芳香族アルキルであり、また R^{15} 、 R^{19} および R^{28} を除く R^2 ～ R^{30} の任意の保護基2つが一緒になって、置換されていてもよい炭素原子数3～8のアルキリデン、置換されていてもよい炭素原子数3～8の環状アルキリデン、置換されていてもよいベンジリデン、または、置換されていてもよいフタロイルを形成してもよい。また、 n が2～25の場合、 R^2 ～ R^8 は、繰り返し単位ごとに同一であっても異なってもよい。]

または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を材料として用いた血管内皮細胞増殖促進用成型物。

【請求項7】請求項6記載の成型物および／または請求項5記載のコーティング剤を使用して製造した血管内皮細胞被覆型人工臓器。

【請求項8】請求項6記載の成型物および／または請求項5記載のコーティング剤を使用して製造した血管内皮細胞被覆型医療用具。

【請求項9】請求項6記載の成型物および／または請求項5記載のコーティング剤を使用して製造した細胞培養用器材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、グルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物を有効成分として含む血管内皮細胞増殖促進剤および細胞培養用組成物に関する。また、前記化合物を側鎖構造にもつ高分子物質を用いて製造した血管内皮細胞被覆型人工臓器、血管内皮細胞被覆型医療用具および細胞培養用器材に関する。

【0002】

【従来の技術】血管内皮細胞は、全身の血管内腔を連続して被覆する一層の細胞群である。正常な血管内皮細胞は、①血管透過性の抑制、②血管内腔の抗血栓化、③血管平滑筋の弛緩、収縮の調節、④血管壁細胞の遊走や増殖の制御のような多彩な機能を果たしており、血管内皮細胞は血管を血管たらしめる中心的存在であると言われている。

【0003】ヒトは血管とともに老いるといわれており、血管壁は年齢とともに障害を受ける。血管壁が障害を受けて破綻すると、血管の破綻は心筋梗塞、大動脈瘤、脳卒中、あるいは壊死といった循環器疾患の形で現れる。血管壁の破綻の最大の原因は動脈硬化である。

【0004】現在の動脈硬化の治療又は予防は、そのほとんどが脂質代謝の改善という面からのアプローチであり、薬剤としては抗高脂血症剤が汎用されている。その他、動脈硬化部位の血管の閉塞を防ぐ目的で抗血小板剤や抗血液凝固剤が投与される。しかし、これらの薬剤は、血管壁の破綻を積極的に治療するものではなく、破綻の原因の一つである高脂血症あるいは破綻の進展原因の一つである血栓形成を押さえ込むことによって破綻の進展を防ぐという間接的な作用を期待するものである。

【0005】動脈硬化の発症、進展には、血管内皮細胞の損傷や機能喪失が重要かつ不可欠であるとされている。前述のように、従来の療法では、治療を行ううえで最も重要な血管の破綻の根本的原因の解消、即ち血管内皮細胞の再生および機能回復については単純に生体がもつ修復機能に依存するのみであった。従って、損傷を受けて本来の機能を喪失した血管内皮細胞の再生や機能回復を促進する、いわゆる「血管内皮再生療法」は従来の治療法の欠点を克服し得る極めて有用な治療法であるといえる。しかし、血管内皮再生療法に利用しうる薬剤は実用化されておらず、優れた薬剤の開発が望まれている。血管内皮再生療法の例としては、実験的に傷害したウサギの血管内皮障害部位に血管内皮細胞成長因子(VEGF)の遺伝子を導入してVEGFを発現させ、その有効性を検討した報告(Asahara, T. et al., Circulation, 94, 3291, 1996)などがある。

【0006】経皮経管的冠動脈形成術(PTCA)は、血管内に入れたバルーンカテーテルを膨らませ(バルーンニング)、動脈硬化の進展によってできた狭窄部位を拡張する手法であり、冠動脈硬化症の確立された治療法の一つである。しかし、術後6ヶ月以内に30~50%の患者に再狭窄が認められ、大きな問題となっている。再狭窄は、バルーンニングによって引き起こされ、急激に進行する一種の動脈硬化症であるといえる。これまで、バルーンニングの手技の工夫やカテーテルの改良などとともに様々な薬剤を用いた治療が試みられてきたが、未だに充分であるとは言い難く、より優れた治療法や薬剤の開発が期待されている。血管内皮再生療法ならば、PTCA後の再

狭窄を効果的に予防できると考えられ(前記のAsaharaらの報告を参照されたい)、これに用いる優れた薬剤の開発が期待されている。

【0007】心筋梗塞などの虚血性疾患の予後は、多くの因子によって影響を受けるが、側副血行路の発達程度は、最も重要な予後決定因子の一つであると考えられている。側副血行路の十分な発達があれば、狭窄や閉塞(梗塞)が生じて、虚血や組織の壊死が押さえられ、梗塞サイズの縮小や予後の改善が得られる。従来、側副血行路形成の機序として、血管内圧や血流の変化が重要視されてきたが、側副血行路形成時に血管内皮細胞や血管平滑筋細胞にDNA合成を伴う細胞分裂像が認められることが報告され、側副血行路の形成過程は、単に既存の吻合血管の物理的要因による拡張だけでなく、少なくともその一部は血管壁構成細胞の増殖が関与する血管新生過程であると理解されるようになってきている。近年、

「血管新生療法」という新しい治療法によって虚血性心疾患を治療しようとする試みがなされている(例えば、Yanagisawa-Miwa, A. et al., Science, 257, 1401, 1992)。血管新生療法とは、虚血組織周辺の血管新生を促進することによって積極的に側副血行路を確保し、虚血組織を保護しようとする試みであり、「pharmacological bypass therapy(薬物投与によるバイパス形成療法)」ともいえる新しい治療法である。しかし、未だに実用化には至っておらず、これに用いることのできる優れた薬剤や治療法の実用化が期待されている。また、血管新生促進活性をもつ物質(例えば、線維芽細胞成長因子)を創傷の治療に利用する試みがなされている(Hockel, M. et al., Arch. Surg., 128, 423, 1993などを参照されたい)。

【0008】人工臓器とは、心臓、血管、心臓弁、肺、脾臓、腎臓、肝臓、皮膚、粘膜などの各種の生体組織および臓器の機能を人工的な材料を用いた成型物やそれを部品として用いた装置によって補助あるいは代行しようとするものである。人工臓器は、生体内に埋入したり、血管へのカニューレションによって引き出した血液を接触させることによってその機能を発揮するため、それらに用いる材料は生体に害を与えることなく使用できる性質、つまり、生体適合性をもたなければならない。人工臓器の生体適合性を規定する最も重要な生体の反応は血栓形成反応である。血栓形成を避けるために、血液と接触しても血栓を形成しない材料、すなわち、抗血栓性材料の開発が試みられてきた。体内で血液と直接触れるのは血管内皮を構成する血管内皮細胞であり、正常な血管内皮細胞の上では血栓は形成されない。当然のことではあるが、最も優れた抗血栓性材料は天然の抗血栓性材料である血管内皮細胞といえる。本来の臓器と同様に人工臓器の血液接触面が血管内皮細胞で被覆されていれば、血栓形成反応は起こらない。血管内皮細胞の抗血栓性を積極的に利用した人工臓器を開発する試みとして新生内

膜治療促進型人工血管などの臨床応用が試みられており、ある程度の成果が得られている（例えば、Noishiki, Y. et al., Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs., 27, 309, 1986）。これまで、細胞親和性の高い材料を用いたり、成型物の有孔性を高くすることによって細胞侵入を促進するなどといった方法でアプローチがなされているが、血管内皮細胞の成長を促進する物質を利用して血管内皮細胞の被覆を促進するといった試みはほとんどなされていない。

【0009】また、人工臓器以外にも、血液と接触する機会のある医療用具にも抗血栓性をもつ材料を用いることが望ましい。特に、ステントのように血管内に留置される体内埋め込み用医療用具は長期間血液と接触し続けることから高い生体適合性（抗血栓性）をもつことが要求される。これらの理由からも、より優れた抗血栓性材料の開発が期待されている。

【0010】さらに、血管内皮細胞の成長促進作用をもつ物質は細胞培養用組成物や細胞培養用器材の材料としても利用可能である。

【0011】なお、本発明者らは、特願平10-120425号において本発明の血管内皮細胞増殖促進剤に使用する式(1)の化合物が血小板粘着凝集抑制作用を有することを示したが、血管内皮細胞増殖促進作用については開示していない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】上記の記述から明かなように、優れた血管内皮細胞増殖促進物質および血管内皮細胞増殖促進作用をもつ高分子物質の提供は医療上ならびに細胞生物学的実験を行ううえでの重要な課題である。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる課題を解決するために鋭意研究を重ねてきた結果、一般式(1)に示される化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物が優れた血管内皮細胞増殖促進作用および血管新生促進作用を有することを見だし、さらに、その化合物を側鎖構造として有する高分子物質が優れた血管内皮細胞増殖促進作用を有することを見だして本発明を完成するに至った。

【0014】すなわち、本発明は一般式(1)で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物を有効成分として含む血管内皮細胞増殖促進剤を提供する。

【0015】本発明の血管内皮細胞増殖促進剤は血管内皮再生療法または血管新生療法のための治療薬または予防薬として有用である。

【0016】本発明はまた、一般式(1)で表される化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を有効成分として含む細胞培養用組成物を提供する。

【0017】本発明はさらに、一般式(1)で表される化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を有効成分とする血管内皮細胞増殖促進用コーティング剤を提供する。

【0018】本発明はさらに、一般式(1)で表される化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を材料として用いた血管内皮細胞増殖促進用成型物を提供する。

【0019】本発明はさらに、前記成型物および/または前記コーティング剤を使用して製造した血管内皮細胞被覆型人工臓器を提供する。

【0020】本発明はさらに、前記成型物および/または前記コーティング剤を使用して製造した血管内皮細胞被覆型医療用具を提供する。

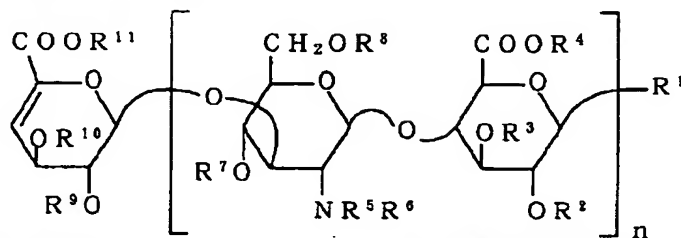
【0021】本発明はさらに、前記成型物および/または前記コーティング剤を使用して製造した細胞培養用器材を提供する。

【0022】

【発明の実施の形態】〔本発明の血管内皮細胞増殖促進剤に使用する化合物〕本発明の血管内皮細胞増殖促進剤中に有効成分として含まれる化合物は、下記一般式(1)で表されるグルクロン酸誘導体およびグルコサミン誘導体を構造中に有する化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物である。

【0023】式(1)

【化17】



〔式(1)中、R¹は保護基または下記式(2)～(5)を表す。式(2)～(5)中、R¹²は水素原子、保護基または下記式(6)～(8)を表し、R¹³は水素原子または保護基を表す。ただし、R¹²およびR¹³が水素原子ま

たは保護基である場合、R¹はCOOR⁴に対してトランス結合あるいはシス結合のどちらであってもよい。

【0024】式(2)

—OR¹²

式(3)

-NHR¹³

式(4)

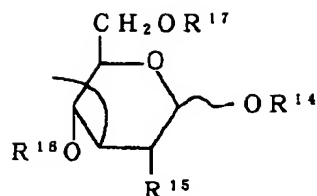
-CH₂R¹³

式(5)

-SR¹³

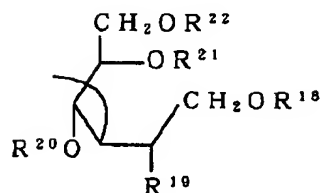
式(6)

【化18】



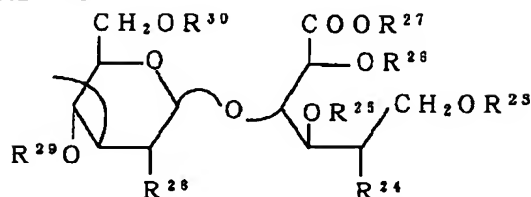
式(7)

【化19】



式(8)

【化20】



また、R¹²が式(6)～(8)である場合、式(6)～(8)中、R¹⁵、R¹⁹およびR²⁸を除くR¹⁴～R³⁰は同一または異なって水素原子または保護基を表し、R¹⁵、R¹⁹およびR²⁸はアジド基または下記式(9)を表す。

【0025】式(9)

-NR³¹R³²

式(9)中、R³¹およびR³²は、同一または異なり水素原子または保護基を表す。

【0026】式(1)中、R²～R⁸は同一または異なって水素原子または保護基を表す。

【0027】式(1)中、R⁹～R¹¹は、同一または異なって水素原子または保護基を表す。

【0028】式(1)中、nは0～25の整数を表す。

(ただし、nが0のときは、R¹は式(2)、R¹²は式(8)で表される基である。)

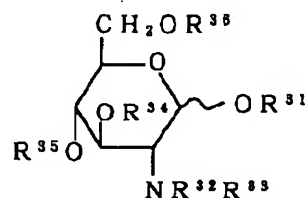
【0029】式(1)および式(6)～(8)中、保護基は互いに同一または異なり、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアルキル、置換されていてもよい炭素原子数2～8の直鎖または分枝鎖のアルケニル、置換されていてもよい炭素原子数1～8のアシル、置換されていてもよい芳香族アシル、または置換されていてもよい芳香族アルキルであり、またR¹⁵、R¹⁹およびR²⁸を除くR²～R³⁰の任意の保護基2つが一緒になって、置換されていてもよい炭素原子数3～8のアルキリデン、置換されていてもよい炭素原子数3～8の環状アルキリデン、置換されていてもよいベンジリデン、または、置換されていてもよいフタロイルを形成してもよい。

【0030】また、nが2～25の場合、R²～R⁸は、繰り返し単位ごとに同一であっても異なってもよい。]

すなわち、本発明の血管内皮細胞増殖促進剤中に有効成分として含まれる式(1)で表される化合物は、下記式(10)で表されるD-グルコサミン誘導体と式(11)で表されるD-グルクロン酸誘導体が結合した構造を有する。

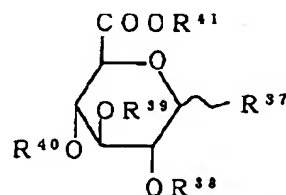
【0031】式(10)

【化21】



[式(10)中、R³¹～R³⁶は水素原子または保護基を表す。] 式(11)

【化22】

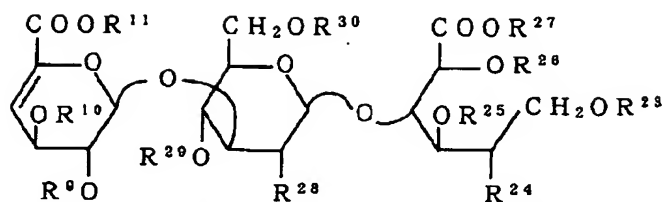


[式(11)中、R³⁷は水酸基または保護基を表し、R³⁸～R⁴¹は水素原子または保護基を表す。]

式(1)において、nは0～25の整数を表すが、nが0のときR¹は式(2)、R¹²は式(8)で表される基である。すなわち、式(1)の化合物は下記式(12)で表される。

【0032】式(12)

【化23】



本発明という保護基とは、Theodora W. Green著の“Productive Groups in Organic synthesis”；第2判；1991年刊に表されている各種の保護基を含むものである。

【0033】上記式(1)～(12)中で示される保護基は、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアルキルとしては例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、第三級ブチル、ペンチル、オクチル、メトキシメチル、第三級ブチルチオメチル、1-エトキシエチル、シロキシメチルまたは2-メトキシエトキシメチルなどを表し、置換されていてもよい炭素原子数2～8の直鎖または分枝鎖のアルケニルとしては、例えば、エテニル、1-プロペニル、2-プロペニル、ブテニルまたはオクテニルなどを表し、置換されていてもよい1～8の直鎖または分枝鎖のアシルとしては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、バレリルまたはピバロイル、またはハロゲン化アシルなどを表し、ハロゲン化アシルとしては例えば、クロロアセチル、ジクロロアセチル、トリクロロアセチル、トリフルオロアセチルなどを表し、置換されていてもよい芳香族アシルとしては例えば、ベンゾイル、パラクロベンゾイルなどを表し、置換されていてもよい芳香族アルキルとしては、例えば置換されていてもよいベンジル、置換されていてもよいジフェニルメチルまたは置換されていてもよいトリフェニルメチルなどを表し、置換されていてもよいベンジルとしては、例えば4-メトキシベンジルなどを表す。さらに、式(1)～(12)中で示される保護基は、R¹⁵、R¹⁹およびR²⁸を除くR²～R³⁰の任意の保護基2つが一緒になって、1つの保護基を表してもよく、即ち置換されていてもよい炭素原子数3～8のアルキリデン、置換されていてもよい炭素原子数3～8の環状アルキリデン、置換されていてもよいベンジリデン、または、置換されていてもよいフタロイルを形成してもよい。置換されていてもよい炭素原子数3～8のアルキ

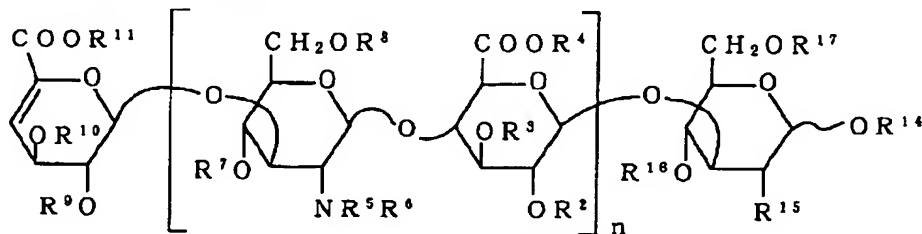
リデンとしては例えば、プロピリデン、ブチリデンまたはオクチリデンなどを表し、置換されていてもよい炭素原子数3～8の環状アルキリデンとしては例えば、シクロペンチリデン、シクロヘキシリデンまたはシクロヘプチリデンなどを表す。水酸基の保護基としては置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖アシル、置換されていてもよい芳香族アルキル、置換されていてもよい炭素原子数2～8の直鎖または分枝鎖のアルケニルまたは置換されていてもよいベンジリデンなどが好ましく、さらに好ましくはアセチル、ベンジル、1-プロペニルまたはベンジリデンなどを表し、アミノ基の保護基としては、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアシルまたは置換されていてもよいフタロイルなどが好ましく、さらに好ましくはアセチルまたはフタロイルなどを表し、カルボキシル基の保護基としては、置換されていてもよい炭素原子数1～8の直鎖または分枝鎖のアルキルまたは置換されていてもよい芳香族アルキルなどが好ましく、さらに好ましくは、メトキシル、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、イソペンチルまたはジフェニルメチルなどを表す。上記の保護基は、同一の化合物中で互いに同一でも異なってもよく、任意に選ばれる。

【0034】式(1)中のnは0～25の整数であり、好ましくは、0～10、特に好ましくは0～5、さらに好ましくは0～2である。

【0035】R¹は上記の記載に合致するものであればよいが、特に、前記式(6)～(8)であること、すなわち、式(1)の化合物が下記式(13)～(15)であることが好ましい。

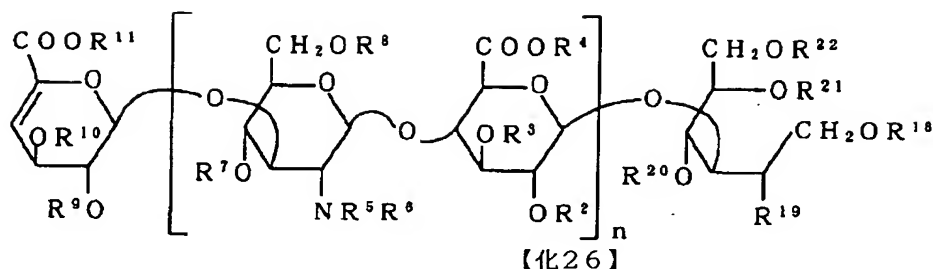
【0036】式(13)

【化24】

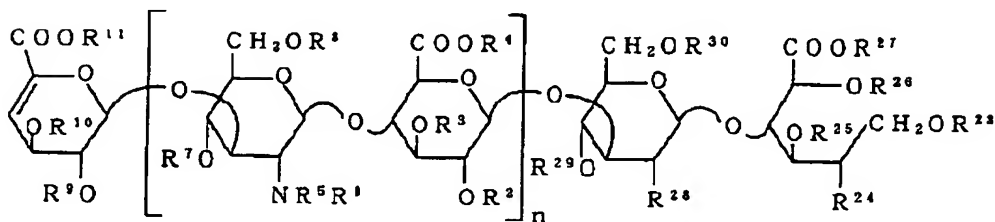


式(14)

【化25】



式 (15)



また、さらに前記式 (13) ~ (15) において、 R^{15} 、 R^{19} 、 R^{28} が前記式 (9) であることが特に好ましい。

【0037】本発明における薬理的に許容される塩とは、式 (1) の化合物を治療に必要な量を投与する場合に、生体に対して悪影響を及ぼさない、あるいは、式 (1) の化合物の有効な薬理的な性質を塩としたことで損なわない塩であることを意味する。具体例としては、ナトリウム塩、カリウム塩またはカルシウム塩などのアルカリ金属またはアルカリ土類金属の塩；フッ化水素酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩などのハロゲン化水素酸塩；メタンスルホン酸塩、トリフルオロメタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩などの低級アルキルスルホン酸塩；ベンゼンスルホン酸塩、*p*-トルエンスルホン酸塩などのアリールスルホン酸塩；フマル酸塩、コハク酸、クエン酸塩、酒石酸塩、シュウ酸塩、マレイン酸塩などの有機酸塩；およびグルタミン酸塩、アスパラギン酸塩などのアミノ酸塩をあげることができる。またさらに、式 (1) の化合物およびその塩は、薬理的に許容される各種の溶媒、例えば水、有機溶媒、緩衝液などの溶媒和物や結晶多形のものなども含まれる。

【0038】式 (1) の化合物は置換基の種類によって不斉炭素原子を有し、不斉中心の存在に基づく光学異性体が存在する場合がある。本発明の化合物には、各々の異性体、および、それらの混合物のすべてが含まれる。例えば、ある光学異性体とその鏡像異性体（エナンチオマー）との混合物、特に、等量混合物であるラセミ体、また、あるいは、ある光学異性体とそのジアステレオマーとの混合物も含まれる。

【0039】〔式 (1) の化合物の製造法〕当然のことではあるが、本発明の血管内皮細胞増殖促進剤に使用する化合物を得る方法には種々の方法がある。例えば、グルクロン酸誘導体やグルコサミン誘導体などを原料にして有機化学的手法によって中間体あるいは目的化合物を合成・修飾する方法や多糖を酸やアルカリなどを用いて

分解して中間体あるいは目的化合物を得る方法などの有機化学的手法、グルクロン酸やN-アセチルグルコサミンなどを原料にして転移酵素や分解酵素の逆反応などを利用して中間体あるいは目的化合物を合成・修飾する方法や多糖を酵素を用いて分解して中間体あるいは目的化合物を得る方法などの生化学的手法、あるいは、微生物や細胞に酵素の遺伝子を導入して原料、中間体あるいは目的化合物、または合成・修飾に用いる酵素を得るなどの遺伝子工学的手法などを、単独あるいは組み合わせて用いる方法をあげることができる。

【0040】式 (1) の化合物の好ましい製造法は前記の特願平10-120425号に詳しく記載されている。

【0041】〔本発明の血管内皮細胞増殖促進剤、およびその投与方法、投与量および剤形〕本発明の血管内皮細胞増殖促進剤は、式 (1) の化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物の少なくとも一つを有効成分として含む。

【0042】本発明の血管内皮細胞増殖促進剤は、通常、全身的または局所的に、そして経口的または非経口的に投与される。投与量は、疾患の種類、症状の程度、投与対象の年齢や体重などの諸条件をもとに総合的に判断し、最適な量を適宜決定するべきであり、特に限定されない。しかし、通常、本発明の血管内皮細胞増殖促進剤に有効成分として含まれる式 (1) の化合物の量として、成人では1日当たり経口投与の場合0.01~100mg/kg、非経口投与の場合0.001~10mg/kgである。投与は必要に応じて1日1回ないし複数回に分けて行われる。

【0043】本発明の血管内皮細胞増殖促進剤の投与は、固体組成物、液体組成物およびその他の組成物の経口投与、注射剤、外用剤、坐剤などの非経口投与のいずれの形態であってもよく、必要に応じて最適な方法が選択される。本発明の血管内皮細胞増殖促進剤は、式 (1) の化合物、その薬理的に許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物の少なくともひとつを有効成分として含有し、これに通常の製剤化に用いられる担

体、賦形剤、その他の添加剤を加えて当業者に公知の方法で調製することができる。製剤用の担体や賦形剤としては、例えば、乳糖、ステアリン酸マグネシウム、デンプン、タルク、ゼラチン、寒天、ペクチン、アラビアゴム、オリーブ油、ゴマ油、カカオバター、エチレングリコールなどやその他常用されるものをあげることができる。

【0044】経口投与のための固体組成物としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤などが用いられる。このような固体組成物においては、少なくともひとつの活性物質（有効成分）が少なくともひとつの不活性な希釈剤、例えば、乳糖、マンニトール、ブドウ糖、ヒドロキシプロピルセルロース、微結晶性セルロース、デンプン、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウムなどと混合される。組成物は、常法にしたがって不活性な希釈剤以外の添加物、例えば、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、繊維素グリコール酸カルシウムのような崩壊剤、グルタミン酸またはアスパラギン酸のような溶解補助剤を含んでいてもよい。錠剤または丸剤は、必要によりショ糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートなどの糖衣や胃溶性または腸溶性物質のフィルムで被覆してもよいし、2つ以上の層で被覆してもよい。さらに、ゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも含まれる。

【0045】経口投与のための液体組成物は、薬剂的に許容される乳濁剤、溶液剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤などを含み、一般的に用いられる不活性な希釈剤、例えば精製水、エタノールなどを含んでいてもよい。この組成物は、不活性な希釈剤以外に湿潤剤、懸濁剤のような補助剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、防腐剤などを含んでいてもよい。

【0046】非経口投与のための注射剤としては、無菌の水性または非水性の溶液剤、懸濁剤、乳濁剤が含まれる。水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、注射用水および注射用生理食塩液が含まれる。非水性の溶液剤、懸濁剤としては、例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油のような植物油、エタノールのようなアルコール類、ポリソルベート80（登録商標）などが含まれる。このような組成物は、さらに防腐剤、湿潤剤、乳化剤、分散剤、安定化剤（例えば、乳糖）、溶解補助剤（例えば、グルタミン酸、アスパラギン酸）のような補助剤を含んでいてもよい。これらは、例えば、精密ろ過膜によるろ過滅菌、高圧蒸気滅菌のような加熱滅菌、あるいは、殺菌剤の配合などの通常の滅菌方法によって無菌化することが可能である。また、無菌の固体組成物を製造し、使用前に無菌水または無菌の注射用溶媒に溶解して使用することもできる。

【0047】非経口投与のためのその他の血管内皮細胞増殖促進剤としては式（1）の化合物の少なくともひとつを有効成分として含み、常法によって処方される外用

液剤、軟膏剤、塗布剤、坐剤、経皮剤、点眼剤などが含まれる。

【0048】〔本発明で使用する高分子およびその製造法〕本発明で使用する高分子とは、式（1）の化合物を側鎖構造として有する高分子化合物のことである。これらの高分子の製造に用いる主鎖となるポリマーは生体適合性ポリマーであることが好ましく、例えば、ポリエチレン、ポリスチレン、ポリウレタン、ポリ塩化ビニル、エチレン酢酸ビニル、ポリプロピレン、ポリカーボネイト、シリコン、ポリメチルメタクリレート、ポリ四フッ化エチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリアミド、ポリスルホン、ABS樹脂、ポリアセタールおよびこれらの誘導体を挙げることができる。主鎖と側鎖の間には適当なスペーサを入れることもでき、これによって側鎖に柔軟性を付与することができる。また、式（1）の化合物を側鎖構造に有する複数の高分子化合物のブロックコポリマーであってもよい。さらには、式（1）の化合物に加えて、ヘパリンなどの血栓形成抑制物質やウロキナーゼなどの血栓溶解酵素などの抗血栓作用を有する物質を併せて結合してもよい。

【0049】当然のことながら、本発明で使用する高分子は製造法によって限定されるものではなく、目的とするものが得られるのであれば、どのような方法を用いても差し支えない。これらの高分子を得るには種々の方法があり、それらの方法を単独あるいは組み合わせる用いることができる。これらの製造法は当業者に公知である。例えば、主鎖となるポリマーのモノマーに本発明の化合物を結合した後、重合反応を行い主鎖ポリマーを形成してもよく、あるいは主鎖ポリマーに本発明の化合物を結合してもよい。

【0050】式（1）の化合物はグルクロン酸誘導体やグルコサミン誘導体といった生体成分の誘導体をその構造中にもつことからわかるように生体適合性が高く、生体に悪影響を及ぼすことが少なく、仮に高分子から式（1）の化合物が脱落したとしても生体に悪影響を及ぼすことが少ない。

【0051】〔本発明のコーティング剤、成型物およびその製造法〕本発明はさらに、式（1）の化合物または前記高分子の少なくともひとつを有効成分とする血管内皮細胞増殖促進用コーティング剤を提供する。このようなコーティング剤は式（1）の化合物または高分子を適当な溶媒に溶解、分散し、人工臓器や医療用具などに塗布、含浸、スプレーコーティングなどの方法によりコーティングすることができる。

【0052】本発明の血管内皮細胞増殖促進用成型物は、式（1）の化合物または前記高分子の少なくともひとつを材料として用いて製造されるものであり、その使用目的に応じてつくられる。したがって、材料のもつ本来の性質を損ねない範囲であれば、どのような方法によってつくられても差し支えない。本発明の成型物を得る

には、化合物や高分子を別に製造した成型物にコーティングする方法、化合物を別に製造した成型物と結合させる方法、化合物や高分子を含む材料から直接成型する方法など、種々の方法があり、それらの方法を単独あるいは組み合わせて用いることができる。

【0053】本発明の成型物は、優れた血管内皮細胞成長促進作用を有するため、人工臓器、医療用具の部品あるいはそれ自体として用いることができる。成型物の形状は用いる材料の性質にもよるが、その使用目的に応じて、フィルム状物、膜状物、管状物、板状物、網状物、繊維状物、布状物などのいずれかの形状にすることができる。

【0054】[本発明の人工臓器およびその製造法] 本発明の血管内皮細胞被覆型人工臓器は、式(1)本発明の化合物あるいは本発明の高分子の少なくともひとつを材料として、または、本発明の成型物の少なくともひとつを部品として用いて製造されるものであり、その使用目的に応じてつくられる。また、このようにして製造された人工臓器あるいはその他の方法で製造された従来型の人工臓器に、さらに本発明のコーティング剤を塗布して製造することもできる。したがって、材料あるいは部品のもつ本来の性質を損ねない範囲であれば、どのような方法によってつくられても差し支えない。

【0055】本発明の血管内皮細胞被覆型人工臓器の例としては、人工血管、人工心臓、心臓ペースメーカー、人工心臓弁、人工腎臓、人工肺、人工心臓、人工脾臓、人工骨、人工関節、人工靱帯などをあげることができる。

【0056】[本発明の医療用具およびその製造法] 本発明の血管内皮細胞被覆型医療用具は、式(1)本発明の化合物あるいは本発明の高分子の少なくともひとつを材料として、または、本発明の成型物の少なくともひとつを部品として用いて製造されるものであり、その使用目的に応じてつくられる。また、このようにして製造された医療用具あるいはその他の方法で製造された従来型の医療用具に、さらに本発明のコーティング剤を塗布して製造することもできる。したがって、材料あるいは部品のもつ本来の性質を損ねない範囲であれば、どのような方法によってつくられても差し支えない。

【0057】本発明の血管内皮細胞被覆型医療用具の例としては、カニューレやステントなどをあげることができる。

【0058】[本発明の細胞培養用組成物] 本発明の細胞培養用組成物は従来の細胞培養用組成物に式(1)の化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を添加して製造することができる。式(1)の化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子を添加する細胞培養用培地には、例えば199培地、MEM(イーグルの最小必須培地)、BME(イーグルの基本培地)、DMEM(ダルベッコ

変法イーグル培地)、RPMI1640、Ham's F12培地、MCDB104、MCDB153を含むがこれに限定されない。本発明の細胞培養用組成物を用いて培養することのできる細胞には、魚類細胞、両生類細胞、鳥類細胞、哺乳動物細胞などの脊椎動物の細胞を含むが、これに限定されない。式(1)の化合物は顕著な血管内皮細胞増殖促進作用および血管新生促進作用を有することから、本発明の細胞培養用組成物は哺乳動物細胞、特に血管内皮細胞の培養時に用いて、試験研究用の培養に利用できることはもちろんのこと、細胞成長因子(例えば、VEGF)のような有用物質の生産に用いたり、火傷の治療用の人工培養皮膚のような治療用組織の製造にも利用することができる。

【0059】[本発明の細胞培養用器材] 本発明の細胞培養用器材は、式(1)の化合物あるいは本発明の高分子の少なくともひとつを材料として、または、本発明の成型物の少なくともひとつを部品として用いて製造されるものであり、その使用目的に応じてつくられる。また、このようにして製造された細胞培養用器材あるいはその他の方法で製造された従来型の細胞培養用器材に、さらに本発明のコーティング剤を塗布して製造することもできる。したがって、材料あるいは部品のもつ本来の性質を損ねない範囲であれば、どのような方法によってつくられても差し支えない。

【0060】本発明の細胞培養用器材の例としては、シャーレ、フラスコ、マイクロプレート、ボトルなどをあげることができる。

【0061】[式(1)の化合物および高分子の血管内皮細胞増殖促進作用] 種々の式(1)の化合物の血管内皮細胞増殖促進作用をウシ大動脈内皮細胞を用いて測定した。その結果、試験に用いた式(1)の化合物はいずれも低濃度で優れた増殖促進作用を示した。また、式(1)の化合物は、血管内皮細胞に特異的に作用し、血管内皮細胞の増殖を促進するサイトカインとして知られる血管内皮細胞成長因子(VEGF)と相乗的に作用し、より優れた血管内皮細胞増殖促進作用を示した。これは、式(1)の化合物が生体由来の内因性および治療目的で投与あるいは誘導された外因性のVEGFと相乗的に作用することによって、より優れた血管内皮細胞増殖促進作用を発現することを示すものである。

【0062】本発明で使用する前記高分子をコーティングしたマイクロプレートでウシ大動脈内皮細胞を培養し、血管内皮細胞増殖促進作用を測定した。その結果、本発明の高分子(本発明の成型物)はいずれも優れた増殖促進作用を示した。

【0063】[式(1)の化合物の血管新生促進作用] 種々の式(1)の化合物の血管新生促進作用をウシ大動脈内皮細胞を用いて測定した。その結果、式(1)の化合物はいずれも優れた血管新生促進作用を示した。

【0064】[発明の効果] 式(1)の化合物およびその薬理的に

許容される塩および溶媒和物または塩の溶媒和物は、優れた血管内皮細胞増殖促進作用と優れた血管新生促進作用を有し、これらの作用に基づく治療薬として有用である。具体的には、血管内皮再生療法あるいは血管新生療法に用いる治療薬および予防薬（血管内皮細胞増殖促進剤、血管新生促進剤）として有用である。さらに具体的には、循環器疾患（急性心筋梗塞、不安定狭心症、慢性安定型狭心症、陳旧性心筋梗塞、心房細動による血栓塞栓症、汎発性血管内血液凝固症候群（DIC）、冠動脈バイパス術後のグラフト閉塞、経皮的冠動脈形成術（PTCA）後の冠動脈の狭窄および閉塞、人工心臓弁置換術後の血栓性合併症（血栓塞栓症、血栓弁）、肺血栓・栓塞症、脳血管障害（一過性脳虚血発作（TIA）、脳梗塞）、末梢動脈閉塞症（閉塞性動脈硬化症、閉塞性血栓性血管炎、血行再建術後の閉塞）、糸球体腎炎、ネフローゼ症候群、その他の血栓症など（本態性血小板症、血栓性血小板減少性紫斑病（TPP）、溶血性尿毒症症候群、抗リン脂質抗体症候群、川崎病、子癇、ベーチェット病）の治療および予防、創傷（褥瘡などを含む慢性皮膚潰瘍、糖尿病性潰瘍、火傷、角膜創傷、化学療法・放射線療法を受けた癌患者の口腔粘膜炎、皮膚移植などの各種手術後の創傷、胃腸組織の損傷など）の治療に対して有効である。

【0065】式(1)の化合物およびこれを側鎖構造として有する高分子は優れた血管内皮細胞増殖促進作用を有し、血管内皮細胞の被覆を促進するため、抗血栓性を必要とする成型物をつくるための材料あるいはコーティング剤として有用である。また、これらの化合物、高分子および成型物は優れた血管内皮細胞増殖促進作用を有し、血管内皮細胞の被覆を促進するため、抗血栓性を必要とする人工臓器、医療用具の部品あるいはそれ自体として有用である。

【0066】さらに、式（１）の化合物または前記化合物の少なくともひとつを側鎖構造として有する高分子は細胞培養用組成物の成分として有用であり、式（１）の化合物およびこれを側鎖構造として有する高分子は細胞培養用器材としての利用が期待できる。

【0067】

【実施例】以下の実施例において、化合物製造例、高分子製造例、成型物製造例、血管内皮細胞増殖促進作用試験例、血管新生促進作用試験例および製剤製造例、をあげて本発明をさら詳しく説明する。なお、当然のことではあるが、本発明は以下の実施例に記載された物質、処方および方法に限定されるものではなく、特許の請求の範囲に含まれるすべての物質、処方および方法を含むものである。

【0068】実施例1：化合物製造例1

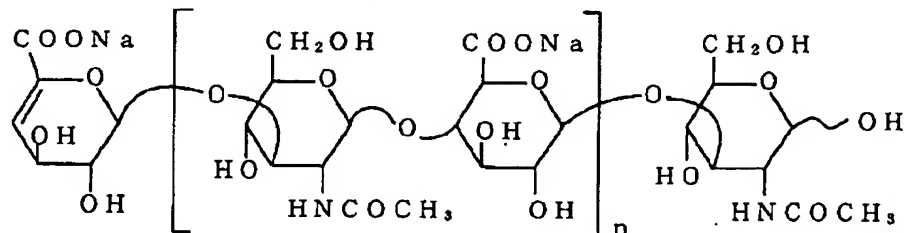
4-デオキシ- α -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル
 (1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコ
 ピランシル(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル

(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノース [ΔHexAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAc (化合物例1)]、4-デオキシ-α-L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノース [ΔHexAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAc (化合物例2)]、4-デオキシ-α-L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノース [ΔHexAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAc (化合物例3)] および4-デオキシ-α-L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-O-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノース [ΔHexAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAc (化合物例4)] の製造ヒアルロン酸ナトリウム(紀文フードケミファ製; 商品名「ヒアルロン酸FCH」) 30 gを蒸留水3 Lに溶解し、40℃となるように加温した。0.1 M水酸化ナトリウム水溶液で溶液のpHを6.0に調整した後、*Streptomyces hyalurolyticus*由来のヒアルロニダーゼ(天野製薬製; 商品名「ヒアルロニダーゼ“アマノ”」)をヒアルロン酸ナトリウム1 mgあたり0.5濁度減少単位となるように添加し、40℃で100時間反応を行った。反応後、公称分画分子量10 kの親水性ポリエーテルスルホン製の限外ろ過(ミリポア製)によって溶液中から酵素を除去した。凍結乾燥することによって溶媒を除去し、分解物(27.4 g)を得た。

【0069】分解物を陰イオン交換クロマトグラフ法（カラム：YMC-Pack IEC-AX，溶離液：A；水，B；0.4M NaCl；リニアグラジェント（30分），検出：UV（232nm））によって分画し（化合物例1、2、3、4の順に溶出）、化合物例1～4を含む画分を得た。各画分をゲルろ過法

(担体:セファデックスG-10, 溶離液:水)によって脱塩後、凍結乾燥して化合物1~4(白色粉末)を得た。収量は、それぞれ、化合物例1:1.7g, 化合物例2:5.9g, 化合物例3:3.4g, 化合物例4:2.2gであった。各化合物はナトリウム塩として得られた。

【0070】化合物例1~4は下記式(16)で表される



高速液体クロマトグラフ法(カラム:TSKgel DEAE-5PW, 溶離液:A;水,B;0.3MNaCl;リニアグラジエント(20分), 検出:UV(232nm);面積百分率法)によって測定した各化合物の純度は97%以上であった。化合物例1~4の各々のウロン酸含量をグルクロノラクトンを標準品としてBitterとMuirの方法(Bitter, T., Muir, H.: Anal. Biochem., 4, 330(1962).)によって、ヘキササミン含量を3N塩酸中100℃で16時間加水分解後、グルコサミン塩酸塩を標準品としてBoasの方法(ただし、樹脂処理なし; Boas, N., F.: J. Biol. Chem., 204, 553(1953).)によって分析したところ、各化合物例の分析値はほぼ理論値通りであった。

【0072】実施例2: 化合物製造例2

4-デオキシ- α -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース[Δ HexA β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcA β 1 \rightarrow 3GlcNAc(化合物例1)], 4-デオキシ- α -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノース[Δ HexA β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcA β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcA β 1 \rightarrow 3GlcNAc(化合物例2)]の製造

ヒアルロン酸ナトリウム(紀文フードケミファ製; 商品名「ヒアルロン酸FCH」)60gを蒸留水3Lに溶解し、40℃となるように加温した。0.1M水酸化ナトリウム水溶液で溶液のpHを6.0に調整した後、Streptomyces hyalurolyticus由来のヒアルロニダーゼ(天野製薬製; 商品名「ヒアルロニダーゼ“アマノ”」)をヒアルロン酸ナトリウム1mgあたり1濁度減少単位となるように添加し、40℃で100時間反応を行った。反応後、公称分画分子量10kの親水性ポリエーテルスルホン製の限外ろ過(ミ

化合物である。式(16)において、nは1~4の整数を示し、nが1のとき化合物例1、2のとき化合物例2、3のとき化合物例3、4のとき化合物例4を示す。

【0071】下記式(16)

【化27】

リボア製)によって溶液中から酵素を除去した。凍結乾燥することによって溶媒を除去し、分解物(53.7g)を得た。

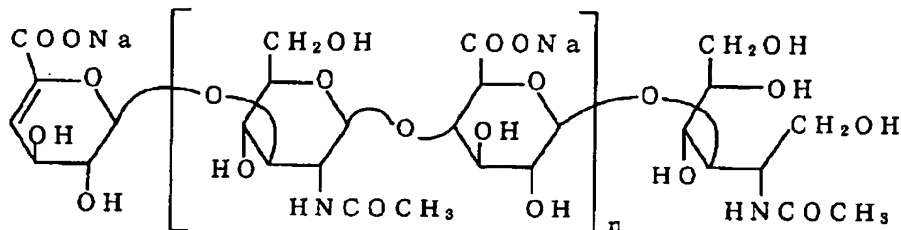
【0073】分解物を陰イオン交換クロマトグラフ法(カラム:TSKgel DEAE-5PW, 溶離液:A;水,B;0.5M酢酸ナトリウム水溶液;リニアグラジエント(A/B(90/10) \rightarrow A/B(60/40);40分), 検出:UV(232nm))によって分画し(化合物例1、2の順に溶出)、化合物例1および2を含む画分を得た。各画分から凍結乾燥することによって水を除去した。凍結乾燥した各画分をエタノールで洗浄して塩を除去し、再度水に溶解した後に凍結乾燥して化合物例1、2(白色粉末)を得た。収量は、それぞれ、化合物例1:18.1g, 化合物例2:29.5gであった。各化合物はナトリウム塩として得られた。

【0074】高速液体クロマトグラフ法(カラム:TSKgel Amide-80, 溶離液:アセトニトリル/水/酢酸/トリエチルアミン(65/35/2/1,v/v), 流速:1.0mL/分, カラム温度:80℃, 検出:UV(232nm);面積百分率法)によって測定した各化合物の純度は97%以上であった。ウロン酸含量とヘキササミン含量を実施例1に示した方法によって分析したところ、値はほぼ理論値通りであった。

【0075】実施例3: 化合物製造例3

4-デオキシ- α -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラニール[Δ HexA β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcA β 1 \rightarrow 3GlcNAcAcOH(化合物例5)], 4-デオキシ- α -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラニール[Δ HexA β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcA β 1 \rightarrow 3GlcNAc β 1 \rightarrow 4GlcA β 1 \rightarrow 3GlcNAcOH(化合物例6)]の製造

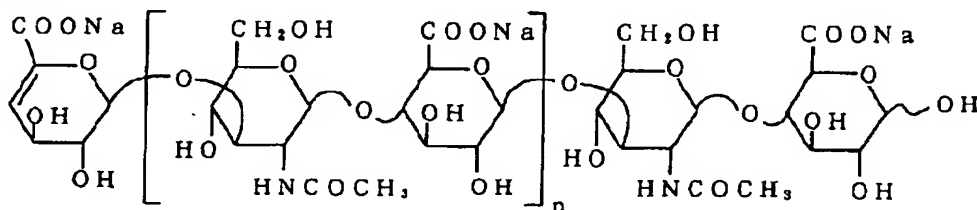
50mgの化合物例1を50mLの3mg/mL水素化ホウ素ナトリウム水溶液に溶解し、室温で1時間処理した。5mLの6M酢酸を加えて反応を停止し、50mLのメタノールを加えた後、エバポレーターを用いて乾固した。さらに、50mLのメタノールの添加および乾固を2回繰り返した。乾固によって残った固形物を5mLの水に溶解し、実施例1と同様にゲルろ過法によって脱塩後、凍結乾燥して化合物例5（白色粉末；44.7mg）を得た。



化合物5および6の純度を実施例2に示した方法によって測定したところ、98%以上であった。ウロン酸含量とヘキササミン含量を実施例1に示した方法によって分析したところ、分析値はほぼ理論値通りであった。

【0079】実施例4：化合物製造例4

4-デオキシ-α-L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-0-β-D-グルコピランウロン酸 [ΔHexAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcA (化合物例7)]、4-デオキシ-α-L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-0-β-D-グルコピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-0-β-D-グルコピランウロン酸 [ΔHexAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcA (化合物例8)]の製造



化合物例7および8の純度を実施例2に示した方法によって測定したところ、98%以上であった。ウロン酸含量とヘキササミン含量を実施例1に示した方法によって分析したところ、分析値はほぼ理論値通りであった。

【0083】実施例5：化合物製造例5

4-デオキシ-α-L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-0-β-D-グルコピランウロニトール [ΔHexAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcA_{0H} (化合物例9)]、4-デオキシ-α-L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-0-β-D-グルコピランウ

【0076】同様の方法で化合物例2を原料として用いて化合物例6を得た。

【0077】化合物例5および化合物例6は式(17)で表される化合物である。式(17)において、nは1~2の整数を示し、nが1のとき化合物5を、2のとき化合物6を示す。

【0078】式(17)

【化28】

化合物例1をReissigらの方法(Reissig, J., L., Strominger, J. L., Leloir, L., F.: J. Biol. Chem., 217, 959 (1953).)に準じてpH9のホウ酸緩衝液中で加熱した。反応液中のホウ酸を実施例3と同様にホウ酸メチルとして除去し、実施例1と同様にゲルろ過法によって脱塩後、凍結乾燥して化合物例7（白色粉末）を得た。50mgの化合物例1を原料としたとき、43.1mgの化合物例7を得た。

【0080】同様に、50mgの化合物例2を原料としたとき、44.8mgの化合物例8（白色粉末）を得た。

【0081】化合物例7および化合物8は式(18)で表される化合物である。式(18)において、nは0~1の整数を示し、nが0のとき化合物7を、1のとき化合物8を示す。

【0082】式(18)

【化29】

ロノシル-(1→3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル-(1→4)-3-0-β-D-グルコピランウロニトール [ΔHexAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcAβ1→3GlcNAcβ1→4GlcA_{0H} (化合物例10)]の製造

化合物例7を実施例3と同様の方法で処理して化合物例9（白色粉末）を得た。20mgの化合物例7を原料としたとき、15.9mgの化合物例9を得た。

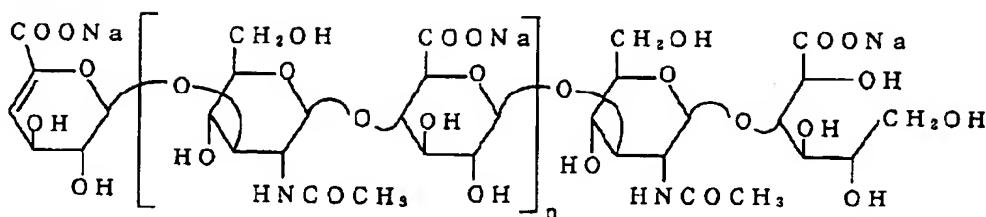
【0084】同様に、20mgの化合物例8を原料としたとき、17.8mgの化合物例10（白色粉末）を得た。

【0085】化合物例9および化合物10は式(19)で表される化合物である。式(19)において、nは0~1の整数を示し、nが0のとき化合物9を、1のとき化合物10を示す。

化合物 10 を示す。

【0086】式(19)

【化30】



化合物 9 および 10 の純度を実施例 2 に示した方法によって測定したところ、98%以上であった。ウロン酸含量とヘキサミン含量を実施例 1 に示した方法によって分析したところ、分析値はほぼ理論値通りであった。

【0087】 实施例6：高分子化合物製造例

ポリ(N-p-ビニルベンジル [0-4-デオキシ- α -L-スレオヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコンアミド]) (高分子例1)、ポリ(N-p-ビニルベンジル [0-4-デオキシ- α -L-スレオヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコンアミド]) (高分子例2)、ポリ(N-p-ビニルベンジル [0-4-デオキシ- α -L-スレオヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコンアミド]) (高分子例3) およびポリ(N-p-ビニルベンジル [0-4-デオキシ- α -L-スレオヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコンアミド])

(高分子例4)の製造

10gの化合物例1を蒸留水5mLに溶解し、メタノール45mLを加えて混和した。その液を40℃に加温したヨウ素のメタノール溶液(17.1g/200mL)に加えて40℃で30分間

放置した。4%水酸化カリウム/メタノール溶液をヨウ素の色が消失するまで徐々に添加した。反応液を氷冷し、析出した沈殿をろ取した。沈殿を冷エタノール、冷エーテルの順で洗浄し、エタノール/水(90/10,w/w)から再結晶することによってカリウム塩を得た。カリウム塩を蒸留水50mLに溶解し、イオン交換樹脂(アンバーライトIR-12B(H⁺型))を充填したカラムに通液して凍結乾燥した。凍結乾燥物にメタノールを加えて減圧濃縮して結晶を得た。結晶に少量のメタノールを加えて溶かし、さらにエタノールを加えて脱水濃縮するという操作を5回繰り返した後、減圧乾固してラクトン化した化合物例1(7.4g.)を得た。

【0088】7gのラクトン化した化合物例1をメタノール50mLに溶解し、p-アミノメチルスチレンのメタノール溶液(2.5g/0.5mL)を加熱還流下に加えた。120分間加熱還流した後、アセトン200mLを加えて結晶化した。結晶をメタノールより2回再結晶させて精製結晶(N-p-ビニルベンジル-[0-4-デオキシ- α -L-スレオ-ヘキサ-4-エンピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコピラノシル-(1 \rightarrow 4)-3-0- β -D-グルコピランウロノシル-(1 \rightarrow 3)-0-2-アセトアミド-2-デオキシ- β -D-グルコンアミド]；3.3g)を得た。

【0089】2gの精製結晶を水2mLに溶解し、重合開始剤としてペルオキシ二硫酸カリウム(0.2mol%)を添加した。室温下で60℃にて24時間加熱して重合反応を行った。重合後、液をメタノール中に注入して、重合体を析出させた。メタノールをデカンテーションで除き、重合体を分離した。重合体を水に溶解し、メタノールから析出させる再沈殿法によって重合体を精製して高分子例1(1.4g)を得た。

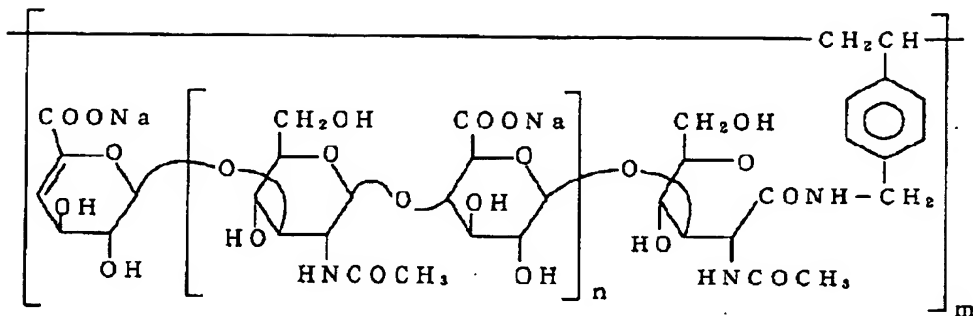
【0090】同様の方法で化合物例2を原料として用いて高分子例2を、化合物例3を原料として用いて高分子例3を、化合物例4を原料として用いて高分子例4を得た。

【0091】高分子例1～4は下記式(20)で表される化合物である。式(20)において、nは1～4の整数を示し、nが1のとき高分子例1、2のとき高分子例2、3のとき高分子例3、4のとき高分子例4を示す。

【0092】光散乱法によって高分子例1～4の重量平均分子量を測定したところ、約4万であった。

【0093】式(20)

【化31】



【0094】実施例7：成型物製造例

化合物例1～4固定ポリエチレン管（成型物例1～4）の製造

Larmら（Larm, O., Lasson, R., Olsson, P.: *Biomater. Med. Dev. Art. Org.*, 11, 161 (1983).）の方法に準じて製造を行った。化合物例1とポリエチレンイミン活性化ポリエチレン管（1.8mmID×100cmL）を0.15M NaCl中、NaB(CN)H₃とpH3.5, 50℃で2時間反応させて化合物例1固定ポリエチレン管（成型物例1）を得た。

【0095】同様の方法で、化合物例2を原料として成型物例2、化合物例3を原料として成型物例3、化合物例4を原料として成型物例4を得た。

【0096】実施例8：式（1）の化合物の血管内皮細胞増殖促進作用1

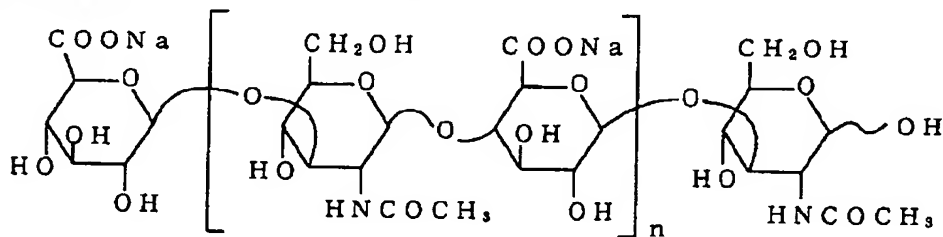
試験には、細胞としてウシ大動脈血管内皮細胞（継代数3）、培地として10% FCS（ウシ胎児血清）、100 units/mLペニシリンG、100 μg/mLストレプトマイシンを含むMEMを用いた。96 ウェルのマイクロプレートに細胞を4×10³個/ウェル（4×10⁴/mL; 100 μL）となるように播種し、既定の終濃度（0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μg

/mL）となるように式（1）の化合物（化合物例1～10）（10 μL；培地に溶解）を添加した。37℃、5% CO₂の条件下で20時間培養した後、化合物の血管内皮細胞増殖に対する作用（指標として、5-ブロモデオキシウリジン（BrdU）の取り込み量を採用）を「細胞増殖ELISA, BrdU発色キット」（ペーリンガー・マンハイム社製）を用いて測定した。

【0097】比較例として、比較化合物1および2についても同様に試験を行った。比較化合物は下記の式（21）で示される化合物である。式（21）において、nは1または2の整数を示し、1のとき比較化合物1（表中、比較1）、2のとき比較化合物2（表中、比較2）を示す。比較化合物1および2は、実施例2に準じて調製した。ただし、ヒアルロニダーゼにはウシ睾丸由来のものを用い、検出は206nmにて行った。化合物の純度は97%以上であり、ウロン酸含量とヘキソサミン含量はほぼ理論値とおりであった。

【0098】式（21）

【化32】



次の式を用いて、各化合物の血管内皮細胞増殖促進作用を評価した。

【0099】促進率（%）＝（各化合物添加試験のBrdU取り込みの増加量）÷（対照試験のBrdU取り込みの増加

量）×100
得られた結果を表1に示した。

【0100】

【表1】

表 1

化合物	促進率 (%)					
	化合物濃度 (μg/mL)					
	0	0.1	0.5	1	5	10
1	100.0	110.2	149.2	198.2	188.2	146.9
2	100.0	105.2	142.5	188.1	179.2	148.0
3	100.0	107.2	139.9	179.2	175.8	136.6
4	100.0	102.1	147.0	180.3	177.7	147.4
5	100.0	101.1	144.2	182.7	169.9	141.1
6	100.0	100.5	143.8	167.9	168.8	142.2
7	100.0	104.8	139.7	172.6	170.0	129.7
8	100.0	103.3	140.9	181.1	168.7	141.3
9	100.0	102.8	139.5	180.3	179.3	133.4
10	100.0	101.1	138.8	178.3	170.0	135.8
比較 1	100.0	100.2	98.8	111.7	100.2	101.5
比較 2	100.0	99.5	101.1	107.3	102.0	99.2

表 1 に示したように、化合物例 1 ～ 10 はいずれも優れた血管内皮細胞増殖促進作用を示した。

【0101】実施例 9：式 (1) の化合物の血管内皮細胞増殖促進作用 2

血管内皮細胞成長因子 (VEGF) との相互作用を検討するために試験を行った。VEGF にはヒト組換え型のもの (血管内皮細胞成長因子、ヒト、組換え体、生化学用：和光純薬製) を用いた。

【0102】試験は実施例 8 と同様に行ったが、化合物添加と同時に VEGF (終濃度 10ng/mL) を添加した。比較試験として、VEGF 単独添加試験 (VEGF のみ添加の試験)

および陰性対照試験 (化合物も VEGF も無添加の試験) も行った。血管内皮細胞増殖に対する作用は実施例 8 と同様に測定した。

【0103】次の式を用いて、各化合物の血管内皮細胞増殖促進作用を評価した。

【0104】促進率 (%) = (各化合物添加試験の BrdU 取り込みの増加量) ÷ (陰性対照試験の BrdU 取り込みの増加量) × 100

得られた結果を表 2 に示した。

【0105】

【表 2】

表 2

化合物	促進率 (%)					
	化合物濃度 (μg/mL)					
	0	0.1	0.5	1	5	10
1	148.5	169.8	211.2	258.3	250.2	206.8
2	148.5	166.2	200.6	249.5	244.0	207.8
5	148.5	160.9	205.0	243.8	231.1	200.4
6	148.5	159.8	205.2	232.2	224.8	205.7
7	148.5	165.0	206.2	235.9	228.7	191.3
8	148.5	168.7	202.9	251.2	224.9	199.2
9	148.5	159.8	200.2	245.6	244.2	196.8
10	148.5	165.2	199.9	243.3	228.7	194.0

なお、表 2 において、化合物濃度 0 の欄に示す促進率は、VEGF を単独添加した場合の促進率を示す。式 (1) の化合物の単独添加試験の結果を示す表 1 および表 2 の結果から、試験した化合物はいずれも VEGF と相乗的に作用し、優れた血管内皮細胞増殖促進作用を示した。

【0106】実施例 10：式 (1) の化合物の血管新生促進作用 1

氷水浴中で冷却しながら NaHCO₃ 不含の 10 倍濃縮 MEM 1 容量に対して再構成緩衝液 (500mM NaOH, 260mM NaHCO₃, 200mM HEPES) 1 容量を混和した後、0.3% コラーゲ

ン塩酸溶液 (pH3.0) 8 容量を加えてよく混和し、コラーゲン溶液とした。24 ウェルのマイクロプレートにコラーゲン溶液 0.5mL を分注し、37℃、30 分間保温してゲルを固めた。コラーゲンゲル上にウシ大動脈血管内皮細胞 (継代数 3 ～ 8) を 5 × 10⁴ 個 / ウェルで播種し、37℃ で約 3 時間培養して細胞を接着させた。その後、培地を取り除き、コラーゲン溶液 0.5mL を重層して 37℃、30 分間保温してゲルを固めた後、各濃度の化合物例 1 ～ 4 を含む 1 mL / ウェルの 2% FBS-MEM 培地を加えて 37℃ で 3 日間 CO₂ インキュベーター内で培養した。3 日間培養

後、形成された血管様の管腔（新生血管）を位相差顕微鏡下、倍率100倍で撮影した。写真をトレースし、マイクロコンピューターイメージングデバイス（ニューロサイエンス社製）を用いて画像解析を行い、単位面積当たりの血管様管腔の長さを測定した。対照試験として、化合物を含まない培地で培養したものについて同様に血管様管腔の長さを測定した。

【0107】次の式を用いて、各化合物のもつ血管新生

促進作用を評価した。

$$\text{【0108】促進率(\%)} = \{ (\text{各試験の管腔長}) - (\text{対照試験の管腔長}) \} \div (\text{対照試験の管腔長}) \times 100$$

得られた結果を表3に示す。

【0109】

【表3】

表 3						
化合物	促進率 (%)					
	化合物濃度 (μg/mL)					
	0	0.1	0.3	1	3	10
1	100.0	212.1	236.4	350.1	430.3	329.7
2	100.0	181.8	244.9	334.2	393.9	345.5
3	100.0	212.1	315.2	327.3	351.5	278.8
4	100.0	224.2	321.2	369.9	406.1	357.6

表3に示すように、化合物1～4はいずれも優れた血管新生促進作用を示した。

【0110】実施例11：式(1)の化合物の血管新生促進作用2

化合物例1および2の血管新生促進作用をラットを用いたディフュージョンチャンバー法によって評価した。すなわち、ディフュージョンチャンバー（膜孔径0.45μm；ミリポア社製）を組み立て、各濃度（0、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ M）の化合物1および2の生理食塩液溶液200μLを封入した。

【0111】Wistar系ラット（オス；体重200-250g）にペントバルビタールを腹腔内投与（10mg/匹）して麻酔

した後、背部を刈毛して希ヨードチンキで消毒した。筋肉を傷つけないように皮膚を切開し、上記の液封入済みディフュージョンチャンバー皮下と筋膜との間に移植した。切開部を縫合し、1週間飼育後、麻酔したラットの背部を切開しチャンバーを露出させ、血管新生の様子を観察後、チャンバーを筋肉ごと切除してホルマリンで固定した。

【0112】結果を表4に示した。表中、+、±、-はそれぞれ新生血管誘導が陽性、擬陽性、陰性であったことを示す。

【0113】

【表4】

表 4					
化合物	誘導能				
	化合物濃度 (M)				
	0	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
1	—	—	±	+	+
2	—	—	—	+	+

表に示すように、化合物例1および2はいずれも優れた血管新生促進作用を示した。

【0114】実施例12：本発明の化合物の急性毒性
本発明化合物の代表例（化合物例1～10）について、ラット（体重300～400g，Wistar系，オス）を用いて急性毒性試験を行ったところ、LD₅₀は500mg/kg以上であった。

【0115】実施例13：高分子化合物から製造される成型物の血管内皮細胞増殖促進作用

高分子例1～4の0.01w/v%水溶液をそれぞれ調製し、96ウエルのポリスチレン製マイクロプレートに0.5mL/ウエルで分注、室温で一晩静置後、液を除去することによりプレートのコートを行った。これらのコート済みプレートを用いて実施例8と同様にウシ大動脈由来の血管内皮細胞の培養を行った。対照試験として未コートのプ

レートを用いた培養を行った。増殖促進作用を実施例8と同様に測定し、次の式を用いて各高分子例（各成型物）の血管内皮細胞増殖促進作用を評価した。

$$\text{【0116】促進率(\%)} = (\text{各試験のBrdU取り込みの増加量}) \div (\text{対照試験のBrdU取り込みの増加量}) \times 100$$

得られた結果を表5に示した。

【0117】

【表5】

表 5

コートした 高分子例	促進率 (%)
1	198.1
2	184.9
3	179.8
4	182.4
未コート	100.0

表5に示したように、高分子例1～4はいずれも優れた血管内皮細胞増殖促進作用を示した。

【0118】実施例14：製剤製造例

錠剤の製造1

化合物例1	10 g
ポリエチレングリコール6000	10 g
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5 g
トウモロコシデンブ	3 g
乳糖	25 g
ステアリン酸マグネシウム	0.5 g

上記成分を秤量する。ポリエチレングリコール6000を70～80℃に加熱し、そこに化合物例1、ラウリル硫酸ナトリウム、トウモロコシデンブおよび乳糖を混合した後、冷却する。固化した混合物を粉砕器にかけ造粒し、顆粒を得る。顆粒をステアリン酸マグネシウムと混合後、圧縮打錠して重量250mgの錠剤とする。

【0119】錠剤の製造2

化合物例2	30 g
乳糖	55 g
ジャガイモデンブ	12 g
ポリビニルアルコール	1.5 g
ステアリン酸マグネシウム	1.5 g

上記の成分を秤量する。化合物例2、乳糖、ジャガイモデンブを均一に混合する。混合物にポリビニルアルコールの水溶液を加え、湿式顆粒造粒法により顆粒を調製

する。顆粒を乾燥し、ステアリン酸マグネシウムを混合後、圧縮打錠して重量200mgの錠剤とする。

【0120】カプセル剤の製造

化合物例3	10 g
乳糖	25 g
トウモロコシデンブ	5 g
微結晶セルロース	9.5 g
ステアリン酸マグネシウム	0.5 g

上記の成分を秤量する。ステアリン酸マグネシウム以外の4成分を均一に混合する。ステアリン酸マグネシウムを加えた後、さらに数分間混合する。混合物をNo. 1のハードカプセルに200mgずつ充填し、カプセル剤とする。

【0121】散剤の製造

化合物例4	20 g
乳糖	79 g
ステアリン酸マグネシウム	1 g

上記成分を秤量する。すべての成分を均一に混合して20%散剤とする。

【0122】坐剤の製造

化合物例2	10 g
ポリエチレングリコール1500	18 g
ポリエチレングリコール4000	72 g

化合物例2を乳鉢でよく研磨して微細な粉末とした後、熔融法によって1gの直腸坐剤とする。

【0123】注射剤の製造

化合物例6	0.1 g
塩化ナトリウム	0.9 g
水酸化ナトリウム	適量
注射用水	100mL

上記成分を秤量する。3成分を注射用水に溶解、ろ過滅菌後、10mLアンプルに5mLずつ分注し、熔封して注射剤とする。

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テマード (参考)
C 1 2 N 5/10		C 0 7 H 7/033	4 C 0 9 0
// C 0 7 H 7/033		C 0 8 B 37/00	G
C 0 8 B 37/00		C 1 2 N 5/00	B

(72)発明者 森山 茂
茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社
社中央研究所内

(72)発明者 玉井 忠和
茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社
社中央研究所内

(72)発明者 西川 正純
茨城県つくば市和台16-2 マルハ株式会社
社中央研究所内

Fターム(参考) 4B029 AA08 AA21 BB11 CC02 CC08
GA02 GB09 GB10
4B065 AA90X BB01 BC01 BC03
BC07 BC41 BC50 CA44
4C057 CC04 EE03
4C081 AA01 AA14 AB32 BA06 BA13
CD052 DC03
4C086 AA01 AA02 EA02 EA22 EA25
MA01 MA04 NA14 ZA36 ZA44
4C090 AA09 BA69 BB02 BB18 BB21
BB33 BB35 BB36 BB53 BB62
DA23 DA24